

伝子の数が多い。このことは、特殊な生存環境に対するらい菌の適応の結果であると考えられる。偽遺伝子は意味の無い配列のように考えられてきたが、近年になりカタツムリやマウスの偽遺伝子がmRNAの発現を制御している例が示された³⁰⁾・³¹⁾。筆者らは、らい菌に高頻度で発現するmRNAをスクリーニングしたところ、その中に偽遺伝子領域に由来する物が多いことを見出した(未発表)。これらが単に近傍の遺伝子のmRNA転写に伴って生じている可能性も否定できないが、その発現量の高さから何らかの生理的役割を果たしている可能性も充分考えられる。らい菌の遺伝子・偽遺伝子数はコンピュータプログラムにより算出されたものであり、必ずしも実際の機能の有無を反映しているとは限らない。らい菌mRNA発現に関するより詳細な解析により、らい菌偽遺伝子配列の新たな機能が解明されるかもしれない。

X. 薬剤耐性機構

ハンセン病の抗菌薬として使用されている薬剤に対する耐性機構解明の現状と今後の展望について概観したい。

1. ダブソン

ダブソンは細菌だけに存在する代謝系の葉酸合成系に作用する。合成系中、酵素dihydropteroate synthase (DHPS) が作用する時、必要となる補酵素、パラアミノ安息香酸 (PABA) の構造類似体としてダブソンは競合的にDHPSに結合し反応を阻害する。多くの耐性菌でこのDHPSの遺伝子*folP*の変異による特定のアミノ酸置換(53位のトレオニンがアラニンやイソロイシン、55位のプロリンがロイシン等)があることが示された³²⁾。変異によりPABAは結合できるが、ダブソンはできないことがその主要な耐性機構と考えられている。

2. リファンピシン

リファンピシンはらい菌のみならず結核菌にも強い殺菌作用を示す効果的な薬剤であるが、耐性菌の報告も多い。薬剤の標的は菌の持つRNAポリメラーゼのβサブユニットで、耐性菌ではこのβ

サブユニットをコードする遺伝子*rpoB*の変異が強く関与している。中でも425位と420位のアミノ酸セリンとヒスチジンの変異が多く報告されている³³⁾。

3. クロファジミン

抗菌剤としての利用とともにらい性結節性紅斑(ENL)の治療薬としても重要な薬剤であるが、その作用機序はほとんど知られていない。明らかにされている作用は、DNAのGCリッチな領域への結合性である³⁴⁾。耐性菌の報告は少ないが³⁵⁾、多剤耐性菌の出現も報告されていることから、早期の作用機序解明及び耐性機構の解明が望まれる。

4. オフロキサシン

ニューキノロン剤で、標的はDNA gyraseである。DNA gyraseは*gyrA*遺伝子にコードされるAサブユニットと*gyrB*遺伝子にコードされるBサブユニットがそれぞれ2つずつ集まった4量体であるが、耐性菌ではこれらの遺伝子に変異が生じる。特に*gyrA*の特定の領域(quinolone resistance determining region: QRDR)がらい菌での耐性に強く関与している。らい菌では*gyrA*のコードするアミノ酸89位のグリシン、91位のアラニンでの変異が報告されている³⁶⁾。

WHOの多剤併用療法(MDT)が奏効し、登録患者数は顕著に減少したにもかかわらず、ダブソンのみならず他の薬剤に対する耐性菌も次々と出現している。ハンセン病患者から分離された菌の10~20%が何らかの薬剤耐性を示している³⁷⁾。さらに、数種の薬剤に同時に耐性を示す多剤耐性菌も出現している³⁵⁾・³⁶⁾。今後の対策が重要である。変異と耐性の相関を利用し様々な耐性菌検出法が考案されているが³⁸⁾、臨床の現場で容易に利用し得る迅速、簡便かつ低コストの方法の開発もまた望まれるところである。薬剤耐性と特定の遺伝子変異は相関関係にあると考えられるが、すべての耐性菌が遺伝子変異により誘導されるとは限らない。従って、他の耐性機構の解明も重要な研究課題となる。クロファジミン耐性機構は不明であり、早期の機構解明が期待される。

XI. 抗菌剤の抗らい菌活性判定法

ハンセン病は、多剤併用療法 (Multidrug therapy, MDT) の導入によって確実な治療と耐性予防が行われている。効果的な菌陰性化をめざす治療を施すために、らい菌の治療薬剤に対する抗らい菌活性を知ることは重要である³⁹⁾。らい菌は、試験管内にて培養増殖できないため、ヌードマウスの足蹠内にて増菌後、薬剤感受性検査を行う。そのため効果判定には、約1年の長時間を必要とする。治療薬剤の抗らい菌活性を調べる方法として、マウス足蹠内接種法⁴⁰⁾、Buddemeyer法⁴¹⁾、BACTEC 460 TB system法⁴²⁾、adenosin triphosphate (ATP) 法⁴³⁾がある。また、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異を調べる遺伝子変異検出法³⁶⁾もある。(表2)

表2 抗菌剤の抗らい菌活性判定法の優位点と欠点

	マウス足蹠内接種法	Buddemeyer 法	BACTEC 460 TB system 法	ATP 法	遺伝子変異検出法
優位点	生体内における薬剤の抗菌活性を知ることが出来る。 他法に比べ比較的少数の菌にて試験ができる。	菌接種後2週間以内で抗菌活性を判定できる。 ATP法より約10倍感度が高い。 菌接種後7日以後毎日測定できる。	菌接種後2週間以内で抗菌活性を判定できる。 ATP法より約10倍感度が高い。 菌接種後毎日自動測定できる。	菌接種後10日で抗菌活性を判定できる。 生物発光法のため、特殊な施設は不要で、廃液、廃材処理が容易。	臨床検体からも検査が可能。 1から2日での耐性遺伝子を検出できる
欠点	臨床検体中のらい菌が少量の場合、増菌操作が必要。 判定までに、らい菌接種後6から10ヶ月という長期間を必要とする。	増菌操作が必要。 放射能使用のための特殊な施設が必要。 廃液・廃材の処理が必要。	増菌操作が必要。 放射能使用のための特殊な施設が必要。 廃液・廃材の処理が必要。	増菌操作が必要。 放射能測定法より感度が悪い。	臨床検体中のらい菌が少量の場合、増菌操作が必要。 耐性遺伝子が不明の場合は検出できない。 耐性の程度が不明

1. マウス足蹠内接種法

正常マウス足蹠内に $10^3 \sim 10^5$ 個のらい菌を接種すると、6~10ヶ月後に菌は、 $10^5 \sim 10^6$ に達する。菌接種と同時に薬剤を混入した飼料を与え、その増殖抑制効果から薬剤の抗らい菌活性を半定量的に判定する。ヌードマウス足蹠内に $10^6 \sim 10^7$ のらい菌を接種した場合は、6~10ヶ月後に $10^9 \sim 10^{10}$ に達する。本方法を用いると増殖巾が大きいため、より正確に抗らい菌活性が判定し得る。

2. Buddemeyer法

Middlebrook 7 H12培地 4 mlに薬剤とらい菌液 (2×10^8 /ml) の0.1 mlを接種し、4日後に ^{14}C -パルミチン酸 ($1 \mu\text{Ci}$) を添加する。11日間培養し経時的にらい菌の代謝により発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量を測定する。 CO_2 発生抑制率を計算し、薬剤の抗らい菌活性を判定する方法である。

3. BACTEC 460 TB system

結核菌の薬剤感受性試験に用いられているBACTEC法をらい菌に適用した方法である。BACTEC 12B培地にらい菌を接種し、らい菌が発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量をBACTEC 460 TB自動測定装置を用いて測定する。菌接種11~18日後のGrowth index (GI) を計算し、GI (対照) > GI (薬剤) の場合に薬剤感性と判定する。

4. ATP法

Middlebrook 7 H 9 培地に薬剤とらい菌液を接種し、10日後に培養液中のATP量をルミノメーターで測定 (生物発光分析法) する。ATP抑制率より薬剤の抗らい菌活性を判定する方法である。

5. 遺伝子変異検出法

らい菌の薬剤耐性に関与している遺伝子の突然変異の有無を調べる方法で、ダプソンは*folP*遺伝子、リファンピシンは*rpoB*遺伝子、キノロン剤は*gyrA*遺伝子が知られている。

XII. 新薬開発

強力な抗らい菌活性を有する抗菌薬の開発と導入は、治療期間の短縮、薬剤耐性化防止、多剤耐性菌の治療、治療完了率の向上などを図る上から極めて重要かつ早期に解決すべき課題である。ハンセン病は皮膚または末梢神経を主病巣とする慢性感染症である。従って、血中半減期が長く、優れた組織移行性・代謝安定性を有する脂溶性薬剤で、慢性毒性の少ない抗菌薬であることが望ましい。

新規抗らい菌薬開発の現状

1. フルオロキノロン系：抗らい菌活性は

ofloxacin (OFLX) <levofloxacin (LVFX) < gatifloxacin (GFLX) , sitafloxacin (STFX) < sparfloxacin (SPFX) <moxifloxacin (MFLX) の順でSPFX⁴⁴⁾ , MFLXが最も強い。STFXとMFLXは、臨床治験中であるが副作用が少なく、強い抗らい菌活性を持つ抗菌薬として期待されている。抗らい菌活性を有するフルオロキノロンの化学構造式は、1位にシクロプロピル基、4位にカルボキシル基、7位にフッ素基、8位に5または6員環、9位にハロゲン基またはメトキシ基を有する抗菌薬である (図13)。

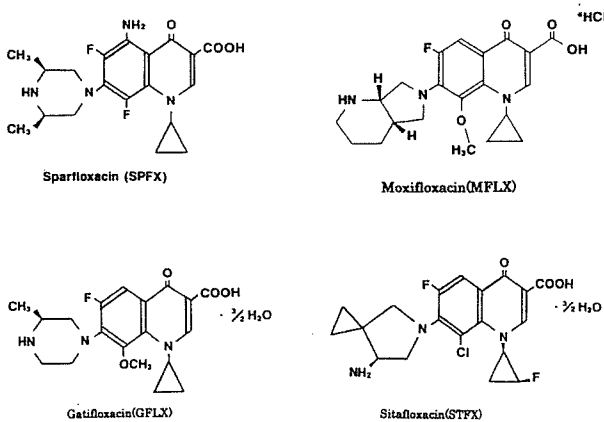


図13 Chemical structures of fluoroquinolone derivatives

2. マクロライド系：抗らい菌活性は azithromycin (AZM) <roxithromycin (RXM) <clarithromycin (CAM) の順でCAMが最も強い。抗炎症作用はAZM<CAM<RXMの順でRXMが最も強い (図14)。

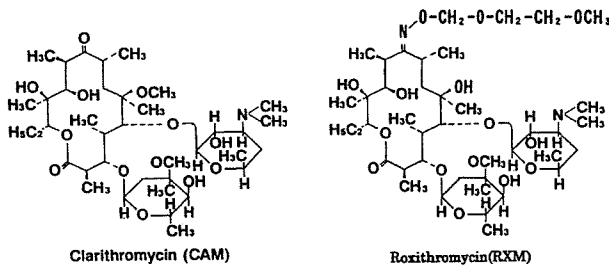
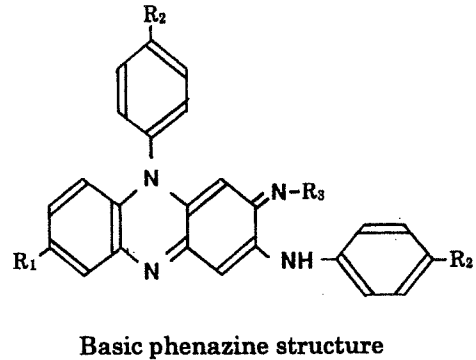


図14 Chemical structures of macrolide derivatives

3. テトラサイクリン系：現在まで抗らい菌活性を示す抗菌薬はminocycline (MINO) のみである。強い抗炎症作用を持ち、らい性結節性紅斑 (ENL) を抑制する。

4. イミノフェナジン系：イミノフェナジン系の染料で、B663は優れた抗らい菌活性と抗炎症作用を有するが皮膚の着色や臓器に蓄積などの課題がある。現在、B746, B4090, B4100, B4101など色素沈着を軽減した新たなイミノフェナジン誘導体⁴⁵⁾の抗らい菌活性が検討されている (図15)。



Phenazine compounds

Phenazine compounds	R ₁	R ₂	R ₃
B663	H	Cl	CH(CH ₃) ₂
B746	H	Cl	C ₂ H ₅
B4090	Cl	Cl	*
B4100	H	3,4Cl	*
B4101	H	3,4Cl	C ₂ H ₅

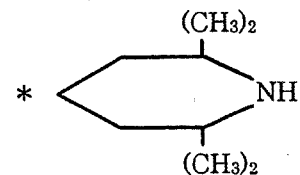


図15 Chemical structures of phenazine derivatives

5. リファマイシン系：rifalazil (KRM-1648)⁴⁶⁾にRFPを凌ぎ、リファマイシン誘導体中最も強い抗らい菌活性を認めたが、連日投与すると白血球減少症などの副作用が出現するため開発が中止された。スピロペリジル基を導入したrifabutin (RFB)⁴⁷⁾にRFPの数倍の抗らい菌活性が報告されているが、国内では未承認である。RFPのピペラジン環のメチル基にサイクロペンチル基を導入したrifapentine (RPT)は、1998年に米国FDAにより抗結核薬として承認されたが、国内では認可されていない。抗らい菌活性は、RFP<RPT<RFBの順でRFBが最も強い (図16)。

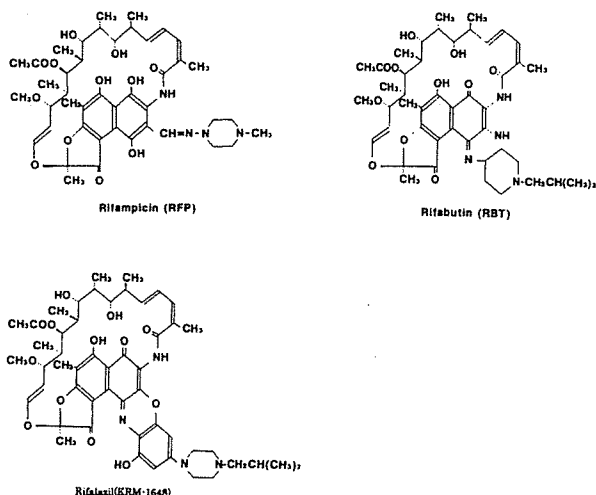
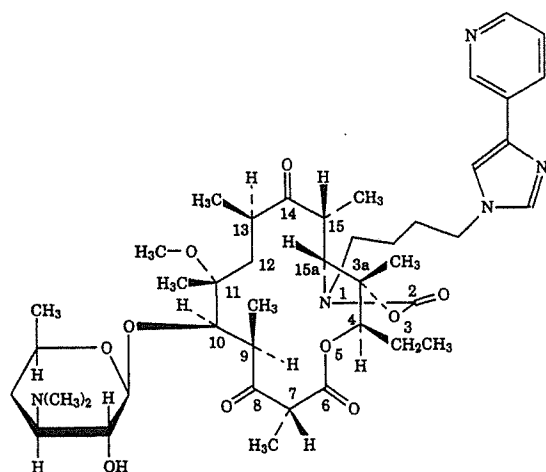


図16 Chemical structures of rifamycin derivatives

6. ケトライド系：マクロラクトン環を基本骨格とし、1位をアミノブチリダゾール基、8位をケトン基、11位をメトキシ基に置換した telithromycin (TEL) ⁴⁸⁾ はKetolide (ケトライド) と称される新しい作用機序を有する抗菌剤である。マクロライド系と比較すると、AZM < TEL < RXM < CAMの順でTELの抗らい菌活性はRXMより弱い (図17)。



Telithromycin(TEL, HMR-3647)

図17 Chemical structures of telithromycin

7. ステロイド系：fusidic acid (FA) は、多菌型患者に対し弱い殺菌的作用と静菌作用を示す。経口及び経皮投与薬として用いられる。経口投与薬は、国内では未承認である (図18)。

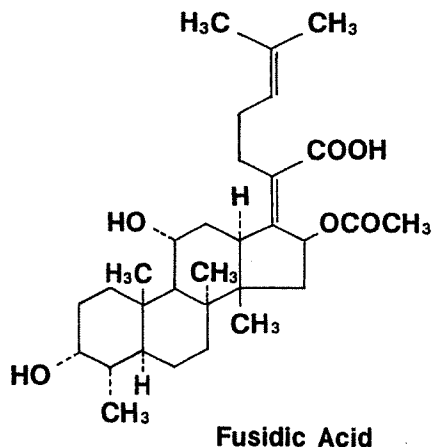


図18 Chemical structures of fusidic acid

今後のハンセン病抗菌化学療法を構築する上で、新しい構造と作用機序を有する強力な新規抗らい菌薬の開発が不可欠である。これらを用いた新たな多剤併用療法の開発が求められている。

XIII. らい菌の遺伝子多型と分子疫学

感染症に対してその抜本的対策を講ずるためには、その感染源、感染様式の解明が必須である。本目的のため、近年多くの微生物について遺伝子多型に基づく型別の開発とその疫学解析への応用がなされ、分子疫学といわれる学問が確立されるに至った。らい菌についても繰返し配列をプローブとしたRestriction fragment polymorphism (RFLP) による型別が試みられたが、らい菌株間に多型性は見い出せず、この方法による型別は不可能であった⁴⁹⁾。その後、多くの試みがなされたが疫学解析に用いるような遺伝子多型の報告には至らなかった。しかし2000年に、らい菌遺伝子中には数塩基からなる繰返し配列が直列し、その繰返し数が菌株により異なること (Variable number tandem repeats: VNTRs) が報告された^{50), 51)}。さらにごく最近、多くの同様のVNTRsの存在が明らかになり、ハンセン病についてもPCRにより増幅したこれらの遺伝子産物についてVNTRsを比較し、疫学解析を行う試みが始まっている。それらについて概説する。

1. *rpoT*遺伝子内の6塩基VNTRs

Matsuokaらはらい菌の*rpoT*遺伝子を比較し、

その中にGACACTの6塩基からなる繰返しが3個(3型)のもの、4個(4型)の2群に分類可能であることを明らかにした⁵⁰⁾。更にその地理的分布を見ると、日本の本州、韓国、中国東部では4型が圧倒的多数を占め、沖縄、東南アジア、アメリカ大陸の一部からの分離株は全てが3型であることが示された。特異的な遺伝子型の微生物の地理的分布は多くの感染症について知られており、それらは過去の人類移動に伴って形成されたと考えられている^{52)・53)・54)}。らい菌についても現代の日本人の成立した過程⁵⁵⁾と相関して2通りの方法により大陸よりもたらされたと推察された。沖縄に分布する3型らい菌は台湾を経て進入し、一方本土に分布する4型らい菌は弥生人となった渡来人とともに朝鮮半島を経て拡散したと考えられ、これにより4型が韓国においても多数を占めたことも説明可能であった。

モンゴロイドがアメリカ大陸に渡り、それとともにいくつかの感染症も移動したことが示されており、アメリカ大陸に分布するらい菌がどのような*rpoT*遺伝子型を示すのか興味を持たれた。パラグアイとペルーから得たらい菌はすべて3型であったが、メキシコからの27株中25株は4型を示し、同じラテンアメリカの国でありながら、全く異なる分布を示した(印刷中)。アメリカ大陸には大きく分けて三つのモンゴロイドのグループが移動したことが知られており⁵⁶⁾、らい菌の異なる型の分布は異なるグループによって形成されたことが推察される。らい菌の遺伝子型別はハンセン病についての研究にとどまらず、人類学とも関連した学際的広がりを持つ興味ある分野になりつつある。

2. TTC繰返し配列多型による疫学解析

Matsuokaらはインドネシアのハンセン病流行地域において同一住居に同居する住民間あるいは患者の鼻粘膜上のらい菌は異なるTTC遺伝子型を示す例が多数あること、また同一家族内の患者の病変部位からのらい菌についても患者間で異なる遺伝子型のらい菌が分布する結果を得た⁵⁷⁾(表3)。なおこの表において同一の遺伝子型であってもTTC遺伝子型の分別能の限界から完全に同一の株とは断定でない。これらの所見は従来言われ

表3 家族内発症例のTTC遺伝子型

	従来の概念による感染源 と思われる患者からのらい菌	家族内患者からのらい菌
ケース1	父親:10	息子:10
ケース2	父親:18	息子:10
ケース3	男子:13	父親:13, 姉:13, 兄:13, 弟:13
ケース4	男子:8	弟:8
ケース5	男子:12	弟:12, 弟:14

ているようなハンセン病の感染は同居する多菌型患者からによるものではなく、他の感染源が存在することを強く示唆する。流行地域における住民からのらい菌遺伝子の検出結果⁵⁸⁾あるいは血清疫学の結果⁵⁹⁾から推察された患者以外の感染源の存在の可能性とよく一致した。

3. 遺伝子型別に有用と考えられる新たなVNTRs

解読されたらい菌遺伝子²⁷⁾の検索の結果、上記2例の他にらい菌遺伝子中には様々な直列繰返し配列が存在することが示された^{60)・61)}。6塩基以下のものはmicrosatellite、6から100塩基のVNTRsはminisatelliteといわれ、それぞれ型別に利用可能と思われる配列が少なくとも33及び11個存在することが示された⁶⁰⁾。今後、菌株間でのそれらの多様性が検討され、TTC遺伝子多型のみによる型別法より更に詳細な疫学解析手法が開発されることと想定される。これにより、より正確な感染源・感染経路・感染様式の解析、再発と再感染の区別などの検討が図られるものと期待される。

おわりに

現在に残されているハンセン病世界の課題を数え上げるときりがない。しかし、これらの中で、ワクチン開発・薬剤耐性菌に対する問題・感染経路の解明・末梢神経障害発症機構の解析とその制御の4つがとりわけ重要と考えられる。科学技術は日進月歩、急速に発展している。分子生物学の分野を中心に、これら重要な課題が次々と征服されていくものと期待する。

文 献

- 1) Janeway CA, Jr Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216,

- 2002.
- 2) Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol* 16: 35-41, 2004.
 - 3) 福富康夫. らい菌によるマクロファージの機能変化. *Jpn J Leprosy* 73: 253-261, 2004.
 - 4) Krahenbuhl JL. Role of the macrophage in resistance to leprosy. In: *Leprosy*, 2nd ed, Hastings RC, Opromolla DVA (ed) , Churchill Livingstone, Edinburgh, p137-155, 1994.
 - 5) Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288: 1647-50, 2000.
 - 6) Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 367-394, 2004.
 - 7) Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261: 1454-7, 1993.
 - 8) Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435-47, 1999.
 - 9) Oftung F, Wiker HG, Deggerdal A, Mustafa AS. A novel mycobacterial antigen relevant to cellular immunity belongs to a family of secreted lipoproteins. *Scand J Immunol* 46: 445-451, 1997.
 - 10) Maeda Y, Brennan PJ, Crick DC, Mahapatra S, Srisungnam S, Takii T, Kashiwabara Y, Brennan PJ. Novel 33-kilodalton lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 70: 4106-4111, 2002.
 - 11) Yamashita Y, Maeda Y, Takeshita F, Brennan PJ. Role of polypeptide region of a 33kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cellular Immunol* 229: 13-20, 2004.
 - 12) Takeda K, Takeuchi O, Akira S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 8: 459-463, 2003.
 - 13) Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. *Infect Immun* 70: 5167-5176, 2002.
 - 14) Kimura H, Maeda Y, Takeshita F, Takaoka LE, Matsuoka M, Makino M. Up-Regulation of T cell stimulating activity of mycobacteria infected macrophages. *Scand J Immunol* 60: 278-286, 2004.
 - 15) Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell Immunol* 222: 69-77, 2003.
 - 16) Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* 103: 511-524, 2000.
 - 17) Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431: 84-87, 2004.
 - 18) Schorey JS, Li Q, McCourt DW, Bong-Mastek M, Clark-Curtiss JE, Ratliff TL, Brown EJ. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun* 63: 2652-2657, 1995.
 - 19) Miyamoto Y, Mukai T, Takeshita F, Nakata N, Maeda Y, Kai M, Makino M. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. *FEMS Microbiol Lett* 236: 227-234, 2004.
 - 20) Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282: 2076-2079, 1998.
 - 21) Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA,

- Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9857-9862, 1999.
- 22) Hagge DA, Oby Robinson S, Scollard D, McCormick G, Williams DL. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. J Infect Dis 186: 1283-1296, 2002.
- 23) 神田秀俊、納富継宣. LAMP法による遺伝子の簡易・迅速増幅. 医学の歩み 206: 470-474, 2003.
- 24) <http://loopamp.eiken.co.jp>
- 25) Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. J Clin Microbiol 41: 2616-2622, 2003.
- 26) Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 41: 4359-4365, 2003.
- 27) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honor'H N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 409: 1007-1011, 2001.
- 28) Nakata N, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Okada N, Sasakawa C. Nucleotide sequence of the *Mycobacterium leprae* katG region. J Bacteriol 179: 3053-3057, 1997.
- 29) Harrison PM, Gerstein M. Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. J Mol Biol 318: 1155-1174, 2002.
- 30) Korneev SA, Park JH, O'Shea M. Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. J Neurosci 19: 7711-7720, 1999.
- 31) Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. Nature 423: 91-96, 2003.
- 32) Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, Hashimoto K, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiol Lett 177: 231-235, 1999.
- 33) Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrob Agents Chemother 37: 414-418, 1993.
- 34) Morrison NE, Marley GM. The mode of action of clofazimine. Intl J Lepr 44: 133-134, 1976.
- 35) Shetty VP, Uplekar MW, Antia NH. Primary resistance to single and multiple drugs in leprosy-a mouse footpad study. Lepr Rev 67: 280-286, 1996.
- 36) Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Mutidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. Antimicrob Agents Chemother 45: 3635-3639, 2001.
- 37) Williams DL, Gillis TP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev 75: 118-130, 2004.

- 38) Honore N, Roche PW, Grosset JH, Cole ST. A method for rapid detection of rifampicin-resistant isolates of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 72: 441-448, 2001.
- 39) 儀同政一、齊藤肇. 治らい薬研究の現状. *Jpn J Leprosy* 64: 174-187, 1995.
- 40) Shepard CC. A kinetic method for the study of activity of drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. *Int J Lepr* 35: 429-435, 1967.
- 41) Buddemeyer E, Hutchinson R, Cooper M. Automatic Quantitative Radiometric assay of bacterial metabolism. *Clin Chem* 22: 1459-1464, 1976.
- 42) Franzblau SG. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* in the BACTEC 460 system. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 2115-2117, 1989.
- 43) 山崎利雄. 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性測定. *臨床検査* 47: 197-199, 2003.
- 44) Gidoh M, Tsutsumi S. Activity of sparfloxacin against *Mycobacterium leprae* inoculated into footpads of nude mice. *Lepr Rev* 63: 108-116, 1992.
- 45) Rosalind M, Van Ledingham, Walker LL, O'Sullivan JF, Shinnick TM. Activity of phenazine analogs against *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* 61: 406-414, 1993.
- 46) Gidoh M, Tsutsumi S, Yamane T, Yamashita K, Hosoe K, Hidaka T. Bactericidal action at low doses of a new rifamycin derivative, 3'-hydroxy-5'-(4-isobutyl-1-piperazinyl) benzoxazinorifamycin(KRM-1648) on *Mycobacterium leprae* inoculated into footpads of nude mice. *Lepr Rev* 63: 319-328, 1992.
- 47) Yoder LJ, Jacobson RR, Hastings RC. The activity of rifabutin against *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 62: 280-287, 1991.
- 48) Bryskier A. Ketolides-telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Infect* 6: 661-669, 2000.
- 49) Williams DL, Gillis TP, Portaels F. Geographically distinct isolates of *Mycobacterium leprae* exhibit no genotypic diversity by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol Microbiol* 4: 1653-1659, 1990.
- 50) Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae GT, Gillis TP, Kobayashi K, Izumi S, Kashiwabara Y. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int J Lepr* 68: 121-128, 2000.
- 51) Shin YC, Lee H, Lee H, Walsh GP, Kim JD, Cho SN. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol* 38: 4543-4538, 2000.
- 52) Sonoda S, Li HC, Cartier L, Nunez L, Tajima K. Ancient HTLV type 1 provirus DNA of Andean mummy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1753-1756, 2000.
- 53) Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, Ondrejka P, Chollet JY, El-Safi S, Ettayebi M, Gresenguet G, Kocagoz T, Chaiyarasamee S, Thant KZ, Thein S, Moe K, Kobayashi N, Taguchi F, Yogo Y. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9191-9196, 1997.
- 54) Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333, 1999.
- 55) Hanihara K. Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review* 2: 1-33, 1991.
- 56) Greenberg JH, Turner II CG, Zegura SL. The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence. *Curr Anthropol* 27: 477-497, 1986.
- 57) Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K, Izumi S. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. *J Clin Microbiol* 42: 741-745, 2004.
- 58) van Beers SM, Izumi S, Madjid B, Maeda Y,

- Day R, Klatser PR. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J Lepr* 62: 1-9, 1994.
- 59) Abe M, Ozawa T, Minagawa F, Yoshino Y. Immunoepidemiological studies on studies on substantial infection in leprosy II. Geographical distribution of seropositive responders with special reference to their possible source of infection. *Int J Lepr* 59: 162-168, 1990.
- 60) Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho SN, Brennan PJ, Vissa VD. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 42: 1666-1672, 2004.
- 61) Truman RW, Fontes AB, de Miranda AB, Suffys P, Gillis TP. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 42: 2558-2562, 2004.

Current advances in the leprosy research activities

Masahiko Makino^{1)*}, Koichi Suzuki¹⁾, Yasuo Fukutomi¹⁾, Yasuko Yamashita¹⁾,
Yumi Maeda¹⁾, Yuji Miyamoto¹⁾, Tetsu Mukai¹⁾, Noboru Nakata¹⁾, Masanori Kai¹⁾,
Toshio Ymazaki¹⁾, Msaichi Gidoh²⁾, Masanori Matsuoka²⁾

1)Department of Microbiology,

2)Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo.

[Received: 12 Nov. 2004]

Key words : Leprosy, *Mycobacterium leprae*, Topics

Due to the advent of multi-drug therapy (MDT) recommended by the WHO, for the treatment of leprosy, presently, leprosy is regarded as a "curable disease". The number of new cases in Japan is relatively very low, due to which the disease is likely to be neglected, but on scientific grounds, there is a necessity to perform in depth studies. Leprosy caused by *M. leprae* is still unclear on various aspects including transmission, immunology, nerve damage etc. Here we introduce the recent advances in the field of basic leprosy research.

*Corresponding author :

Department of Microbiology, Leprosy Research Center,
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, 189-0002,
Japan.

TEL: 042-391-8211 FAX: 042-391-8212

E-mail: mmaki@nih.go.jp

特別講演Ⅲ

抗酸菌細胞壁分子を標的とした抗酸菌感染症の診断・治療方法の開発

小林 和夫*

Molecules of the mycobacterial cell wall as potential targets in clinical applications

Kazuo KOBAYASHI*

Mycobacterial diseases, including tuberculosis, leprosy, and disease due to nontuberculous mycobacteria, are the major cause of death from infectious diseases around the world. The pathogenicity of mycobacteria is related to their ability to escape killing by ingested macrophages, latent infection, and induce delayed-type hypersensitivity. This has been attributed to several components of the mycobacterial cell wall, such as surface glycolipids, lipoarabinomannan, and mycobacterial DNA binding protein. From the aspect of my research interests, I have focused on mycobacterial glycolipids, glycopeptidolipids, and mycobacterial DNA binding protein of cell surface in this article. Surface molecules of mycobacteria exert pleiotropic activities in both the microbe and host, and thus participate in the pathogenesis of mycobacterial diseases. The better understanding of mycobacterial pathogenicity may open the new avenue for the development of therapeutic and prophylactic interventions.

はじめに

世界の年間総死亡は約 5,700 万人、その内訳として、循環器疾患（虚血性心疾患や脳血管障害など）：1,670 万人、感染症：1,490 万人、悪性新生物：710 万人であり、感染症は現在でも全世界の総死亡の約 1/4 を占め、人類に大きな健康被害を招来している。感染症による死亡（1,490 万人/年）の主要な原因として、急性呼吸器感染症（肺炎など）：396 万人、後天性免疫不全症候群（AIDS：結核の合併を含む）：277 万人、下痢性疾患：180 万人、結核：156 万人、マラリア：127 万人や麻疹：61 万人などがある¹⁾。

抗酸菌感染症には結核、非結核性抗酸菌（nontuberculous mycobacteria: NTM）感染症やハンセン病などがあり、現在でも、多くの抗酸菌感染症患者が存在し、人類に甚大な健康被害を提供している。全世界では約 20 億人（全人口の 1/3）が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染、1 年間に 800 万人が結核を発病、156 万人が死亡し、有病者は 2,200 万人である。今後 10 年間、少なくとも、8,000 万人が発病、2000 万人が死亡することが推定されている。日本（2004 年）では年間約 3 万人（罹患率人口 10 万対：23.3）が結核を発病し、2.3 千人（死亡率：1.8）が死亡し、有病者は 2.7 万人（有病率：21.1）、結核は単一病原体による感染症として、世界最大である。疫学的に懸念される事項として、1) 急速な人口の高齢化に伴う高齢者結核の増加（70

* 国立感染症研究所免疫部
Department of Immunology,
National Institute of Infectious Diseases

歳以上の占める割合：約40%), 2) 国内地域格差の拡大, 3) 多剤耐性結核菌の出現(初回耐性：1%, 獲得耐性：20%)や4) ヒト免疫不全ウイルス感染症(後天性免疫不全症候群)の重複感染などがある。

結核菌の病原性

結核菌の病原性(表1)として, 1) 宿主防御機構からの逸脱や2) 遅延型過敏反応(細胞性免疫応答の負の側面)の誘導が特徴的であり, その結果, 結核菌感染から発病に至る長期の潜伏期間, 組織破壊を伴う肉芽腫炎症が特徴的である。

結核菌病原因子として, 細胞壁表層構成成分が関与していると考えられている²⁾。病原因子として, 1) 細胞壁表層糖脂質, 2) lipoarabinomannan, 3) 補体活性化因子, 4) 熱ショック蛋白質や5) 抗酸菌DNA結合蛋白質などがある(表1)。本稿では, 特に, 細胞壁表層糖脂質や抗酸菌DNA結合蛋白質(MDP1)について, 筆者らの研究を中心に概説する。

抗酸菌細胞壁ミコール酸糖脂質

結核菌の脂質は乾燥菌体重量の10%以上, 細

胞壁成分の20%以上を構成し, 他の一般細菌に比し, 極めて多い。事実, 結核菌の全ゲノムは約4.4 Mb(大腸菌: 4.6 Mb)であり, 蛋白質を規定している遺伝子は約4000, 脂質代謝に関与している酵素は250以上, 大腸菌が50であることから, 結核菌の脂質代謝が極めて旺盛であることが遺伝子情報からも判明している³⁾。結核菌細胞壁の脂質として, mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex, lipoarabinomannan (LAM), lipomannan, phosphatidyl-myo-inositol, sulfolipid (SL), trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)/cord factor, phenolic glycolipidやlipooligosaccharidesなどの糖脂質が特徴的である⁴⁾(図1)。

特に, アシル化 trehalose 脂質化合物である TDM/cord factor や SL が結核菌に特徴的であり, 結核菌-宿主関係, すなわち, 病原性や毒性の発現に関与している。肉芽腫炎症は発症機序により, 異物性(T細胞非依存性)および過敏性(T細胞依存性)に大別される。TDMを無胸腺ヌードマウスや未免疫マウスに投与することにより, 肉芽腫を惹起できること, TDM免疫マウスではTDM誘導肉芽腫が増強されることや遅延型

表1 抗酸菌の病原性と病原因子

病原性	宿主防御機構から逸脱 遅延型過敏反応の誘導	
	化学的性状	生物学的活性
	細胞壁表層ミコール酸糖脂質 (TDM, SL)	肉芽腫誘導やP-L融合の阻害
病原因子	Lipoarabinomannan	マクロファージ活性化の阻害, TNF- α 誘導による組織障害, Th1細胞応答抑制性サイトカインの誘導
	補体活性化因子	補体受容体3や4, オプソニン化による貪食能の亢進
	65kDa熱ショック蛋白 DNA結合蛋白	宿主の免疫的交叉反応性による自己免疫の誘導 接着や侵入の促進
	外毒素	mycolactone (<i>M. ulcerans</i>)

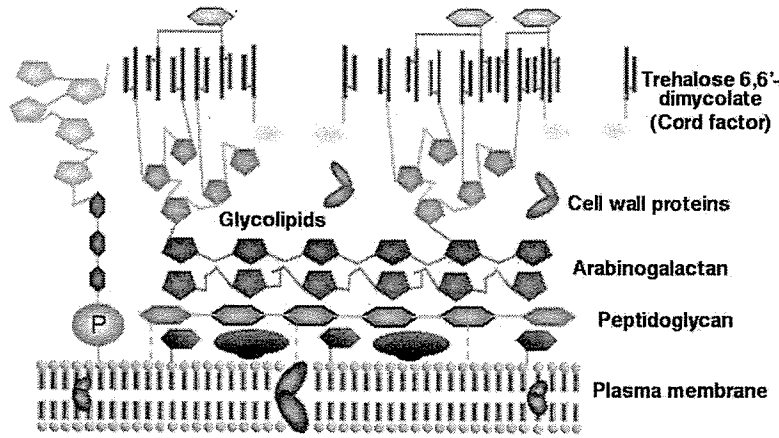


図1 抗酸菌細胞壁の構造と構成成分

過敏反応／細胞性免疫の指標である足蹠腫脹反応が誘導されることから、TDMは異物性および過敏性の両機序を介して、肉芽腫を形成する⁵⁻⁷⁾。事実、TDM誘導肉芽腫病変は多量の細胞性免疫起動性サイトカイン (IL-12やIFN- γ) を含み、活動性に伴い、消長する。従って、結核肉芽腫の発現に異物性および過敏性の両機序が複合関与し、結核肉芽腫は混合性肉芽腫である。肉芽腫形成には病変局所への血中単球の流入や活性化が必須であり、このため、局所のcc-ケモカイン産生や血管新生が重要な役割を演じる(図2)。TDMは血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を誘導し、局所の血管新生に寄与している⁸⁾。加えて、TDMは宿主免

疫担当細胞 (胸腺や脾臓) にアポトーシスを誘導し、その結果、細胞内寄生病原体の増殖や生存を困難にし、さらに胸腺内自己反応性T細胞を除去、Th1/Th2細胞の分化を制御することにより自己免疫疾患の発症を防止している可能性がある⁹⁾。しかし、SLはP-L fusion 阻害 (宿主細胞内生存) を発揮したが、炎症・免疫惹起やアポトーシス誘導活性を全く示さず、TDMと対照的である^{5,8,9)}。アシル化 trehalose 脂質化合物は結核菌細胞壁表層に存在し、1) 結核菌の宿主細胞内生存、2) 炎症・免疫惹起物質 (肉芽腫炎症、遅延型過敏反応、血管新生など) や3) アポトーシス誘導活性を有する多機能分子である(図2)。

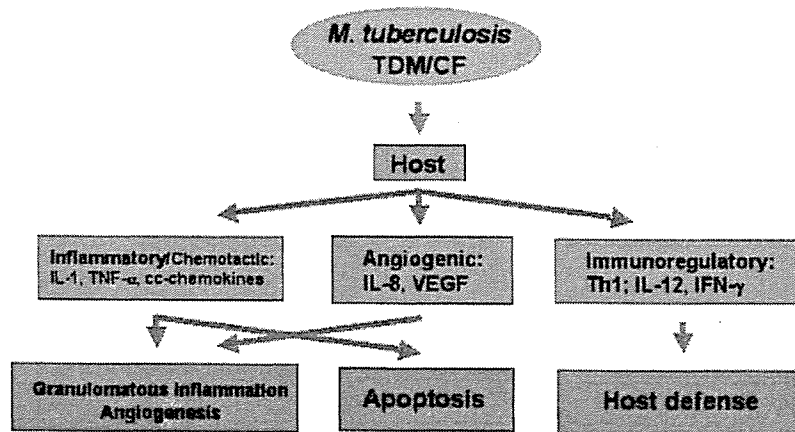


図2 結核菌ミコール酸糖脂質に対する宿主応答

M. avium complex (MAC)

特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL)

MAC 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20% を占める。MAC は環境菌であり、普遍的に存在し、臨床および病原体診断の確定には臨床経過を考慮するため、長期間を要する。また、MAC は抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。行政的に、ヒト-ヒト感染がないため、「結核予防法」による隔離を要しないが、多くの MAC 感染症患者は抗酸菌塗抹陽性の時点で保健所長に届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。

MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 抗原を用いた迅速・簡便血清診断法の開発を目的とした^{10, 11)}。MAC-GPL 抗原は MAC, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum* や *M. fortuitum* (肺の非結核性抗酸菌感染症の原因菌として *M. chelonae*, *M. scrofulaceum* や *M. fortuitum* 感染症は稀) に存在したが、結核菌群 (結核菌や BCG) では欠如していた。GPL を用いた MAC 感染症の血清診断法は感度および特異度ともに良好な成績 (90% 以上) を示し (図 3), また、血清抗 GPL 抗体価は MAC 感染症の疾患活動性を反映した (図 4)。したがって、GPL 抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価

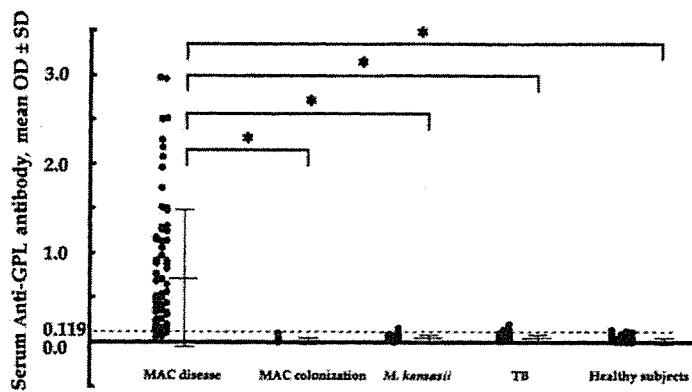


図 3 MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 抗原を用いた血清診断

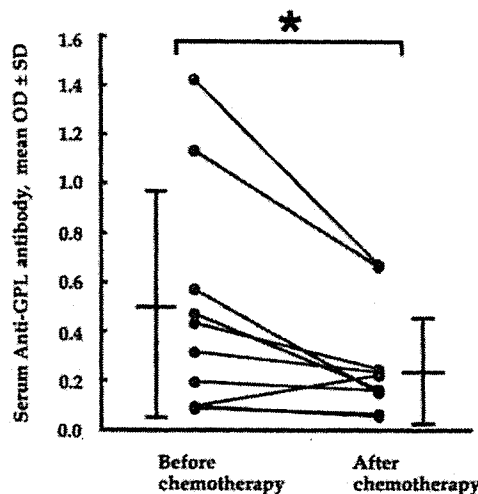


図 4 血清抗 GPL 抗体価は MAC 感染症の活動性を反映する

に有用であり、今後、大規模臨床試験など、臨床応用が期待される。

抗酸菌 DNA 結合蛋白質

(mycobacterial DNA-binding protein 1 : MDP1)

遅発型抗酸菌が定常期や休眠期において最も大量に発現する蛋白質である MDP1 (分子量: 28 kDa) は抗酸菌体内や細胞壁表層に存在する抗酸菌特異的蛋白質である。機能的に細胞質内 MDP1 は核酸結合性を示し、転写および翻訳阻害活性を有し、そのため、休眠機構、さらに、潜伏感染に関与していることが示唆されている。他方、菌表層 MDP1 の生物学的意義は不明であった(図 5)。

筆者らは結核菌やウシ型結核菌 (BCG) などの抗酸菌から抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1, 分子量 28 kDa) を精製、遺伝子の塩基配列を決定、生物学的意義を解析した¹²⁾。MDP1 の発現強度は対数増殖期 < 定常期 = 衰退期であった。また、MDP1 は抗酸菌細胞質や表層に局在していた。機能的に細胞質 MDP1 は抗酸菌 DNA と結合し、DNA や RNA 合成、さらに、蛋白合成を阻害し、その結果、抗酸菌の増殖速度を遅延させた。他方、抗酸菌表層 MDP1 は非貪食性気道上皮細胞表面に存在するグリコサミノグリカン (ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロ

イチン硫酸など) に結合した。抗酸菌-気道上皮細胞の接着・侵入は抗 MDP1 抗体やグリコサミノグリカン (特に、ヒアルロン酸) で阻害されたことから、MDP1-グリコサミノグリカン相互作用を介して、結核菌が気道上皮細胞に接着・侵入している(図 6)。In vivo 感染実験結果から、抗 MDP1 抗体やグリコサミノグリカンの結核菌感染前、或いは、感染後投与でも有効であり、すなわち、予防・治療の両者に有効な介入手段であることが判明した。

結核菌は細胞内寄生病原体であるため、感染の成立には宿主細胞へ接着・侵入・貪食が必須となる。しかし、宿主細胞の結核菌貪食に補体受容体やマンノース受容体の関与が報告されていたが、接着・侵入に関する結核菌や宿主細胞の分子機構はほとんど不明である。結核菌を吸入しても、宿主細胞に接着・侵入を阻止することにより、感染成立や発病を回避することが理論的に可能である。すなわち、結核菌の接着・侵入機構は有望な治療・予防標的候補であり、その阻害は結核の治療・予防戦略になることが期待される¹³⁾。薬剤標的遺伝子を改変することにより生ずる耐性結核菌にも同様な接着・侵入機構が機能していることが想定され、接着・侵入機構の阻害は薬剤耐性結核にも有効な治療・予防戦略となるであろう。したがって、殺菌・静菌を目的とした抗結核化学療法

- **Binds to DNA through guanine and cytosine**
- **Constitutes about 7% of cellular proteins in mycobacteria**
- **Localization:**
 - Intracellular; around nucleoid, 50S ribosomal subunit
 - Mycobacterial cell wall
- **Function:**
 - Intracellular; slow growth and dormancy/latent infection
 - Cell wall: attachment/invasion

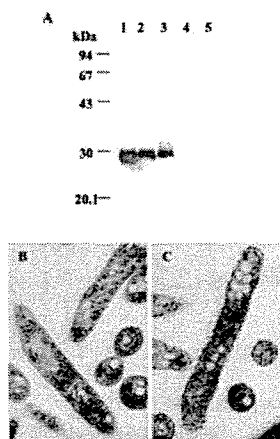


図 5 抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1) の性状

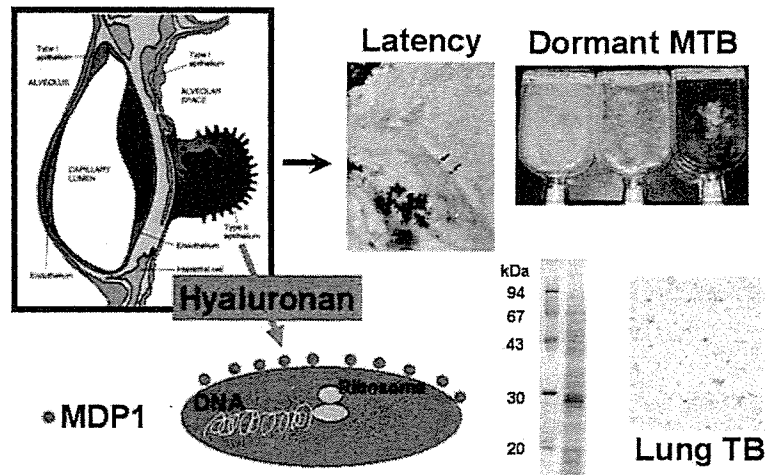


図6 細胞外および細胞内 MDP1 の機能と役割

とはまったく異なり、結核菌の細胞接着・侵入機構の阻害を目的とした抗結核療法を狙う戦略であり、従来にない独創的なアプローチである。

おわりに

結核菌など抗酸菌細胞壁構成成分は抗酸菌-宿主関係における多機能分子群¹⁴⁾であり、病原性発現機序の理解、さらに、この機序の解明は新規診断や治療方法、加えて、ワクチン開発に寄与するであろう。

謝 辞

本稿に示した著者の成績は主として前任部署である公立大学法人大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学の教室員、大学院生や共同研究者の成果であり、感謝に堪えない。本研究は厚生労働省厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）、文部科学省 科学研究費補助金（特定領域研究および基盤研究C）、日米医学協力研究会結核・ハンセン病専門部会、大阪結核研究会および大阪市立大学都市問題研究により支援された。

文 献

1) Morens, D.M., G.K. Folkers, and A.S. Fauci. The

challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242-249. 2004.

- 2) Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 463-496. 2003.
- 3) Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, III, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B.G. Barrell. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544. 1998.
- 4) Brennan, P.J., and H. Nikaido. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63. 1995.
- 5) Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.* **69**: 810-815. 2001.
- 6) Kobayashi, K., C. Allred, R. Castriotta, and T. Yoshida. Strain variation of bacillus Calmette-Guérin-induced pulmonary granuloma formation is correlated with anergy and the local production of migration inhibition factor and interleukin-1. *Am. J. Pathol.* **119**: 223-235. 1985.

- 7) Sato, I.Y., K. Kobayashi, T. Kasama, S. Kaga, K. Kasahara, H. Kanemitsu, K. Nakatani, T. Takahashi, R.M. Nakamura, E. Skamene, and T. Yoshida. Regulation of *Mycobacterium bovis* BCG and foreign body granulomas in mice by the Bcg gene. *Infect. Immun.* **58**: 1210-1216. 1990.
- 8) Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and K. Kobayashi. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect. Immun.* **68**: 5991-5997. 2000.
- 9) Hamasaki, N., K.I. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi, and I. Yano. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.* **68**: 3704-3709. 2000.
- 10) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito, and K. Kobayashi. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 1328-1335. 2002.
- 11) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, and K. Kobayashi. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**: 44-51. 2005.
- 12) Aoki, K., S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and K. Kobayashi. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **279**: 39798-39806. 2004.
- 13) Matsumoto, S., M. Matsumoto, K. Umemori, Y. Ozeki, M. Furugen, T. Tatsuo, Y. Hirayama, S. Yamamoto, T. Yamada, and K. Kobayashi. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* **175**: 441-449. 2005.
- 14) Fujiwara, N., and K. Kobayashi. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**: 281-286. 2005.

結核における肉芽腫炎症と 宿主防御の統御

大阪市立大学大学院
医学研究科感染防御学

教授 小林和夫
こばやし かず お

【要旨】

世界で約二〇億人が結核菌に既感染、毎年八八〇万人が結核を発病、二〇〇万人が死亡している。結核菌-宿主関係として、①宿主防御機構からの逸脱や、②遅延型過敏反応の誘導、その結果、感染から発病に至る長期の潜伏期間や組織破壊を伴う肉芽腫炎症が特徴的である。

はじめに

世界の年間総死亡は約五七〇〇万人で、その主な内訳として、循環器疾患（虚血性心疾患や脳血管障害など）一六七〇万人、感染症一四九〇万人、悪性新生物七一〇

万人であり、感染症は現在でも世界の総死亡の四分の一強を占め、人類に大きな健康被害を招来している。感染症による死亡（一四九〇万人/年）の主要な原因として、急性呼吸器感染症（肺炎など）三九六万人、後天性免疫不全

◆キーワード

結核菌-宿主関係
細胞性免疫
潜伏感染
再興感染症
サイトカイン

症候群（AIDS、結核の合併を含む）二七七万人、下痢性疾患一八〇万人、結核一五六万人、マラリア一二七万人や麻疹六一万人などがある。

全世界では、約二〇億人（全人口の三分の一）が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染、毎年八八〇万人が結核を発病、二〇〇万人（AIDS合併を含む）が死亡し、有病者は二二〇〇万人である。今後一〇年間、少なくとも、八〇〇〇万人が発病、二〇〇〇万人が死亡することが推

定されている。日本（二〇〇三年）では年間三万二〇〇〇人（罹患率人口一〇万対二・四・八）が結核を発病し、二二〇〇人（死亡率一・八）が死亡し、有病者は三万人（有病率二・三・三）であり、結核は単一病原体による感染症として、世界最大である。

結核は結核菌-宿主関係から成立し、その結果、病変形成と宿主防御を招来する。結核の代表的な病変は病理形態学的に「肉芽腫炎症」であり、宿主防御として九〇%の結核菌感染者が防御機序により発病を回避している。しかし、結核における「病変形成と宿主防御」の詳細な細胞・分子機序は未解明である。

本稿では、結核における「病変形成と宿主防御」の細胞・分子機序を概説する。

結核菌の概要

結核菌（*M. tuberculosis*）の生物学的特徴として、①細胞内寄生性、②脂質成分に富む細胞壁、③好気性、④遅発育性、⑤空気（飛沫核）感染、⑥慢性炎症、および⑦遺伝

表1 結核菌の特徴

細胞内寄生性	桿菌 (0.2~0.6 × 1~10 μm), 宿主細胞, 特にマクロファージ内で抗菌機構から逃れて増殖
細胞壁	脂質成分が豊富なため, 疎水性であり, 化学物質にも安定, グラム染色に難染色性, 抗酸性
好気性	酸素分圧の高い臓器 (肺など) で増殖し, 病変を形成
遅発育性	至適温度: 37℃, 倍加時間: 約12~15時間, 培養集落形成に4~8週間
感染形式	飛沫核/空気感染
病原性	慢性炎症, 肉芽腫, 乾酪壊死, 空洞形成, 線維化
遺伝子	全ゲノム (約4.41 Mb) の解読

子の解読などがある(表1)。結核菌など抗酸菌は、基本的に外毒素や内毒素非産生性であるが、例外的に *M. ulcerans* (西アフリカ諸国やオーストラリアで猛威を振るっている *Buruli* 潰瘍の原因

因菌) が外毒素 (mycolactone, 別名 polyketide toxin, 宿主組織に壊死を惹起する) を産生する。炎症病変や組織障害は、結核菌に対する感染免疫応答過程で宿主から産生されるサイトカインをはじめとする生理活性物質に依存している³⁰⁾。

結核菌の細胞壁は長鎖脂肪酸(ミコール酸)に富んでおり、グラム染色では難染色性を示す。そのため、抗酸性(Ziehl-Neelsen, Kinyoun)染色や蛍光染色が用いられる。分裂倍加時間は約一二〜一五時間の遅発育菌であり、感染伝播は飛沫核(空気)感染による。

宿主防御機構では、マクロファージ・サイトカイン-T細胞応答系、すなわち細胞性免疫が役割を

演じ、細胞内殺菌物質として、グスタ物質(反応性酸素化合物質や反応性窒素化合物質)が寄与している。その結果、結核菌感染者の約一〇%が一生涯において結核を発病する。病変は慢性炎症、肉芽腫、乾酪壊死、空洞形成や線維化などが特徴的である。

M. tuberculosis H37Rv の全ゲノム塩基配列が解明された³¹⁾。今後、遺伝子解析を基盤とした科学的戦略が推進され、分子/遺伝子標的を視点とした新規診断法、抗結核薬の開発、薬剤耐性獲得機構の解明や新規ワクチン開発が展開されるであろう。

結核病態の細胞・分子機構

結核菌の病原性として、(1)宿主防御機構から逸脱した細胞内生存および増殖(細胞内寄生病原体)や、(2)遅延型過敏反応(細胞性免疫応答の負の側面)の誘導が特徴的であり、その結果、結核菌感染から発病に至る長期の潜伏期間や組織破壊を伴う肉芽腫炎症が発現する³²⁾。

結核菌の細胞内寄生性と潜伏感染

肺結核患者(特に、喀痰塗抹陽性)から曝露された約三〇%に結核菌感染が成立し、感染者の約一〇%が一生涯において結核を発病する。有効な感染防御応答により、九〇%の感染者は結核菌を封じ込め、発病を回避している。宿主に気道を介し侵入した結核菌はマクロファージに貪食され、マクロファージ食胞体(ファゴソーム)と水解小体(リソソーム)の融合を阻害することにより、酸性化されず、食胞体内で生存し続ける(細胞内寄生病原体)。

結核菌は宿主内で潜伏感染し、潜伏感染した結核菌は宿主免疫機構の破綻(老化、免疫抑制薬/副腎皮質ステロイド薬投与、栄養障害、HIV感染/AIDSなど)により、発育・増殖を再開し、結核を発病する(内因性再燃)。人類の約三分の一が結核菌に潜伏感染している事実を考慮すると、潜伏感染機序を解明することは新規抗結核薬やワクチン開発を促進し、その

結果、結核制圧に寄与するであろう。

潜伏感染した結核菌の特性として、(1) 定常期に発現するσ因子 (sigF) 遺伝子、対数増殖期には未発現や(2) 糖代謝から脂質代謝への変換が知られている。sigF欠損結核菌は肉芽腫内で生存不能であり、肉芽腫内生結核菌は glyoxylate shunt (脂肪酸から糖代謝への変換酵素系、哺乳動物の冬眠におけるエネルギー代謝変換に類似) を亢進させている¹⁰⁾。

また、潜伏感染結核菌は mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDPI, 分子量約二八kDa) を多量に発現している。MDPIは抗酸菌体内や表層に存在する抗酸菌特異的蛋白質である。機能的に、細胞質内MDPIは核酸結合性を示し、転写および翻訳阻害活性を有し、そのため休眠機構、さらに潜伏感染に関与していることが示唆されている。

他方、菌表層MDPIの生物学的意義は不明であった。しかし最近、MDPIが宿主細胞表面に存在するムコ多糖(グリコサミノ

グリカン)、特にヒアルロン酸に結合し、抗酸菌の接着/侵入に関与することが判明した¹¹⁾。また、*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) や結核菌の宿主細胞接着が、ヒアルロン酸やMDPIの細胞接着阻害物質であるDNAや抗MDPI抗体で抑制された。

これらの結果は、抗酸菌の上皮細胞への接着/侵入におけるヒアルロン酸の重要性を示し、MDPIが菌の接着/侵入を促す接着分子であることを示唆している。実際、ヒアルロン酸や抗MDPI抗体をマウス気道感染モデルに投与した結果、感染菌数が著しく減少した。この成果は、結核菌MDPIが治療標的として有望な候補になる可能性を示している。

結核性肉芽腫炎症の機序

肉芽腫病変は病理形態学的に「巣状炎症」であって、主としてマクロファージ、マクロファージが活性化または分化した細胞と考えられる類上皮細胞や多核巨細胞などが集積あるいは増殖して惹起さ

れた病変¹²⁾である。発症機序により、過敏性(免疫性)と異物性肉芽腫に分類される。過敏性肉芽腫は免疫応答(特に、T細胞性)により惹起され、異物性肉芽腫は免疫応答が関与せずに、惹起物質が直接炎症性細胞を刺激することにより誘導される(図1)。

抗酸菌性肉芽腫は、抗酸菌に対する細胞性免疫発現によって増強されるが、細胞性免疫が発現しない未免疫マウスや無胸腺ヌードマウスでも肉芽腫が形成されることから、過敏性および異物性因子の複合した混合性肉芽腫病変である^{13) 14)}。

肉芽腫病変部にマクロファージやT細胞浸潤が認められ、これらの細胞は炎症や免疫の制御に重要なサイトカインを産生している。肉芽腫炎症局所には、病変活動性に一致してインターロイキン(IL)-1、腫瘍壊死因子(TNF)-α、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、マクロファージ炎症性蛋白(MIP)-1αや単球走化性蛋白(MCP)-1などが存在する。さらに、これらのサイトカインを不溶化担体に結

合させて実験動物や培養系に投与/添加することによって肉芽腫が形成される。すなわち、IL-1、TNF-α、MIF、MIP-1αやMCP-1などは肉芽腫誘導性サイトカインである^{10) 12) 15)}。MIP-1αやMCP-1はCC-ケモカインとして単球走化活性を、MIFはマクロファージ遊走阻止活性を有し、病変部への単球の流入や集積に関与している。

IL-1やTNF-α自身は単球走化活性をほとんど示さないが、単球由来MIP-1αやMCP-1産生/誘導活性が顕著であることから、IL-1やTNF-αに認められた肉芽腫誘導活性はCC-ケモカインを介する間接的効果と考えられる。このことは、ツベルクリン皮内反応陽性ヒト末梢血単球を結核菌やツベルクリン蛋白で刺激すると最も早期(二四時間以内)にIL-1が誘導され、遅延型皮内反応が発現する四八〜七十二時間後にMCP-1が誘導される事実からも支持される^{16) 17)}。

肉芽腫誘導性サイトカインの主な産生細胞はマクロファージであ